

**PCT**

**NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE  
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL  
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES**

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:  
TANIGAWA, Hidejiro  
c/o TANIGAWA AND ASSOCIATES,  
Patent Firm  
6F, Iwata Bldg., 5-12, Iidabashi 4-  
chome  
Chiyoda-ku, Tokyo 102-0072  
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 11 October 2001 (11.10.01)		
Applicant's or agent's file reference 01PF220-PCT		<b>IMPORTANT NOTICE</b>
International application No. PCT/JP01/02936	International filing date (day/month/year) 05 April 2001 (05.04.01)	Priority date (day/month/year) 05 April 2000 (05.04.00)
Applicant TORAY INDUSTRIES, INC. et al		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
- US**

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:
- AU,EP,JP**

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 11 October 2001 (11.10.01) under No. WO 01/74420

**REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)**

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

**REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))**

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

<p style="text-align: center;">The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No. (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer</p> <p style="text-align: center; margin-left: 100px;">J. Zahra</p> <p>Telephone No. (41-22) 338.83.38</p>
---	--



(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001 年 10 月 11 日 (11.10.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/74420 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: A61M 1/36, B01J 20/26

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/02936

(22) 国際出願日: 2001 年 4 月 5 日 (05.04.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2000-103328 2000 年 4 月 5 日 (05.04.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 東レ株式会社 (TORAY INDUSTRIES, INC.) [JP/JP]; 〒103-8666 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号 Tokyo (JP).

鹿児島市桜ヶ丘6丁目45-10 Kagoshima (JP). 井田伸夫 (IDA, Nobuo) [JP/JP]; 〒520-0844 滋賀県大津市国分1丁目37-31 Shiga (JP). 増子早苗 (MASUKO, Sanae) [JP/JP]; 〒525-0027 滋賀県草津市野村1丁目24番7-109 Shiga (JP).

(74) 代理人: 谷川英次郎 (TANIGAWA, Hidejiro); 〒102-0072 東京都千代田区飯田橋4丁目5番12号 岩田ビル6階 谷川国際特許事務所内 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AU, JP, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 丸山征郎 (MARUYAMA, Ikuro) [JP/JP]; 〒891-0175 鹿児島県

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: ADSORBENTS FOR HIGH MOBILITY GROUP PROTEINS AND COLUMN FOR PURIFYING BODY FLUID

(54) 発明の名称: ハイモビリティグループタンパクの吸着材および体液浄化カラム

(57) Abstract: Adsorbents for high mobility group proteins (HMG proteins) whereby HMG proteins in a body fluid can be eliminated. These adsorbents are composed of a water-insoluble support on which a substance having a functional group capable of forming a hydrogen bond and/or a hydrophobic functional group is immobilized.

(57) 要約:

体液中のハイモビリティグループタンパク (HMGタンパク) を除去することができる、HMGタンパクの吸着材が開示されている。本発明の吸着材は、水素結合可能な官能基及び／又は疎水性の官能基を有する物質が固定化された水不溶性担体から成る。

WO 01/74420 A1



## 明細書

ハイモビリティーグルーブタンパクの吸着材および体液浄化カラム

### 技術分野

5 本発明は、体液中等のハイモビリティーグルーブタンパク（以下、「HMGタンパク」と略すことがある）を吸着する吸着材およびそれを用いた体液浄化カラムに関するものである。本発明は、ヒト血液中のHMGタンパクを除去することにより、敗血症などの病態を改善させる用途に好適に用いられる。

### 背景技術

10 HMGタンパクは、真核細胞内に存在する一群の非ヒストン性のDNA結合タンパクであり、HMG-1、HMG-2、HMG14、HMG17、HMG-1（Y）等が知られている。HMGは本来細胞内でDNAに結合して転写の促進や細胞の増殖などの機能に関与すると考えられてきたが、神経細胞の表面に存在して神経突起を伸張させる因子として  
15 見いだされたアンフォテリンがHMGタンパクの一つであるHMG-1であることが示され、HMGタンパクが幅広い作用を有する可能性が示されている。

最近、このHMG-1が細胞外に分泌され、全身性炎症反応、敗血症性ショックの強力なメディエーターとして作用するという興味深い報告  
20 が出された（Wangら（1999）、Science vol.285、p248）。すなわち、マウスにリポポリサッカライド（LPS）を投与すると8-24時間後に血清中のHMG-1濃度が顕著に上昇し、マウスは死に至る。精製したHMG-1自体をLPSと同時にマウスに投与した場合にも相乗的に作用して致死活性を示し、また抗HMG-1抗体を投与するとLPSによる致死作用が抑制されることから、HMG-1がエンドトキシンショックの重要なメディエーターであることが示された。ヒトにおいても、敗  
25 血症患者血中でHMG-1濃度が顕著に上昇し、特に死亡例において高いことが示された。HMG-1は、出血性ショックにおいても血中濃度

の上昇が認められ (Ombrellino ら (1999)、Lancet vol. 354、p1446)、さらには HMG に属する他のタンパク HMG-1 (Y) も、LPS 刺激により産生が誘導されることが報告されている。

また、自己免疫性肝炎、炎症性腸疾患、全身性リウマチ性疾患などにおいて、HMG-1、HMG-2、HMG-14、HMG-17 などの HMG タンパクに対する自己抗体が産生されることが認められており、HMG タンパクはこれらの炎症性疾患への関与も示唆されている (Sobajima ら (1997)、Clin. Exp. Immunol. vol. 107、p135 など)。さらには、HMG タンパクが癌の増殖に関与することも報告されている (Taguchi ら (2000)、Nature vol. 405、p354)。

このように、HMG タンパクは本来生体に必要な機能を有するものであるが、敗血症のような病態においては細胞外に過剰に分泌されて病態悪化を引き起こし、生体を死に至らしめる物質である。この HMG タンパクにより引き起こされる病態を改善するためには、例えば上述のマウスの実験に示されたように、抗体のように HMG と結合してその作用を阻害する医薬品を投与する方法が考えられる。しかし、HMG タンパクが細胞内および細胞表面で生体に必要な機能を有することを考えると、HMG 活性を阻害する薬剤の投与は、生体に重大な副作用を引き起こす懸念がある。つまり、生体に好ましくない細胞外の HMG タンパクを、選択的に体内から除去する手段が望まれる。

HMG タンパクと結合しうる物質としては、上述の抗体の他にもヘパリン、RAGE 等いくつかの物質が報告されているが (Hori ら (1995)、J. Biol. Chem. vol. 270、p25752 など)、これらの HMG タンパク結合性の物質を体内からの HMG タンパクの除去に用いるという着想はこれまで全くなく、体液中から HMG タンパクを除去しうる材料はこれまで知られていなかった。

#### 発明の開示

従って、本発明の目的は、体液中の HMG タンパクを効率良く除去する

ことができるHMGタンパクの吸着材を提供することである。

本願発明者らは、鋭意研究の結果、特定の官能基を有する物質を水不溶性担体に固定化することにより、体液中のHMGタンパクを効率良く除去することができることを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、水素結合可能な官能基及び／又は疎水性の官能基を有する物質が固定化された水不溶性担体から成るハイモビリティーグループタンパクの吸着材を提供する。また、本発明は、カラムと、該カラムに充填された上記本発明の吸着材とを含むハイモビリティーグループタンパク除去用体液浄化カラムを提供する。また、本発明は、上記本発明の吸着材と体液とを接触させて体液中のハイモビリティーグループタンパクを該吸着材に吸着させることを含む、体液中のハイモビリティーグループタンパクの吸着方法を提供する。さらに、本発明は、上記本発明の吸着材の、体液中のハイモビリティーグループタンパクの吸着用材料の製造のための使用を提供する。

本発明の吸着材を体液と接触させることにより、体液中のHMGタンパクが該吸着材に効率良く吸着され、体液からHMGタンパクを除去することができ、生体に好ましくない細胞外のHMGタンパクを除去することができる。

#### 発明を実施するための最良の形態

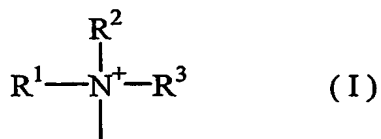
上記の通り、本発明のHMGタンパクの吸着材は、水素結合可能な官能基及び／又は疎水性の官能基を有する物質が固定化された水不溶性担体から成る。

ここで、水素結合可能な官能基としては、1級アミノ基、2級アミノ基、3級アミノ基、イミノ基、4級アンモニウム基などのカチオン性の官能基；カルボキシル基、硫酸エステル基、スルホン酸基、リン酸基などのアニオン性の官能基；並びに水酸基、チオール基、アルデヒド基、カルボニル基、尿素結合、チオ尿素結合等の極性の大きな官能基ないしは構造を挙げることができる。

これらのうち、カチオン性の官能基及びアニオン性の官能基が好ましい。

カチオン性の官能基のうち、特にアミノ基及び4級アンモニウム基が好ましく、特に好ましいアミノ基及び4級アンモニウム基として下記一般式(I)に示される

構造のものを挙げることができる。



(ただし、式中、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 及び $\text{R}^3$ は、互いに独立に、水素原子又は炭素数1～5のアルキル基を示す)

なお、本明細書及び請求の範囲において、単に「アルキル基」と言う場合には、  
5 直鎖状のものと分枝状のものの両者が包含される。

上記一般式(I)中、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 及び $\text{R}^3$ が、互いに独立に、水素原子又は炭素数1若しくは2のアルキル基であるものがさらに好ましく、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 及び $\text{R}^3$ が全てメチル基であるものが特に好ましい。これらの官能基は単独でも組み合わせても採用することができる。

10 また、アニオン性官能基としては、上記した官能基のうち、特にカルボキシル基、硫酸エステル基及びスルホン酸基が好ましい。これらの官能基は単独でも組み合わせても採用することができる。

また、疎水性の官能基としては、炭素数6以上のアルキル基又は芳香族基が好ましい。アルキル基の炭素数の上限は特にないが、通常30程度である。芳香族基の好ましい例としては、フェニル基及びナフチル基、並びにこれらに1又は  
15 複数のアルキル基（炭素数は好ましくは1～30）が置換したアリールアルキル基及びアラルキル基を挙げることができる。これらの官能基は単独でも組み合わせても採用することができる。

水不溶性担体に固定化される物質は、上記した官能基の1種又は2種以上を有する物質であれば特に限定されるものではなく、低分子合成化合物、合成高分子；アミノ酸、糖などの天然の低分子化合物；オリゴ糖、多糖などの糖質あるいはその誘導体；ペプチド、タンパクあるいはその修飾物；DNA、RNAなどの核酸およびその誘導体、その他の生理活性物質、生体高分子、微生物由来の化合物などが用いられる。これら物質の大きさは、滅菌処理に対して安定性の高い分子量20000以下のものが好ましく、分子量5000以下のものはさらに好ましい。とりわけ、分子量  
20  
25



50～5000程度の範囲ものが好ましい。

例えば、上記したカチオン性官能基を有する物質の好ましい例として、リジン、アルギニンのようなアミノ酸およびこれらのアミノ酸から成る、又はこれらのアミノ酸を多く含む（好ましくは30モル%以上）ペプチド等を挙げることができ、例えば、ポリリジンを挙げることができる。

アニオン性官能基を有する物質の好ましい例として、多数の硫酸エステル基を含む硫酸化多糖であるヘパリン及び硫酸デキストラン並びにこれらの誘導体等を挙げることができる。なお、これらにおいて必要なものは硫酸エステル基であるので、ここで言う「誘導体」は、ヘパリン又は硫酸デキストランの硫酸エステル基を維持したあらゆる誘導体が包含される。また、カルボキシル基又はスルホン酸基を有する物質の好ましい例としてアスパラギン酸、グルタミン酸のようなアミノ酸およびこれらのアミノ酸から成る、又はこれらのアミノ酸を多く含む（好ましくは30モル%以上）ペプチド等を挙げることができる。

疎水性の官能基を有する物質の好ましい例として、フェニルアラニン、トリプトファンのような疎水性アミノ酸、これから成る、若しくはこれを多く含む（好ましくは30モル%以上）ペプチド等を挙げることができる。

上記した各官能基の密度は、特に限定されないが、官能基が固定化された水不溶性担体の乾燥重量 1 g 当たりの上記官能基の数（官能基が複数種ある場合にはそれらの合計）は、 $1 \mu\text{mol} \sim 1 \text{mmol}$  程度が好ましく、さらに好ましくは  $10 \mu\text{mol} \sim 1 \text{mmol}$  程度である。

また、水不溶性担体に、HMGタンパクに対する抗体を固定化して成る材料もHMGタンパクの吸着材として用いることができる。

本発明に用いられる水不溶性担体の材料は、ポリアミド、ポリイミド、ポリ（芳香族ビニル化合物）、ポリエステル、ポリメチルメタクリレート、ポリスルホン、ポリエチレン、ポリビニルアルコール、ポリテトラフルオロエチレンなどの合成高分子や、セルロース、コラーゲン、キチン、キトサン、デキストランおよびそれらの誘導体を含む天然高分子、などが好適に用いられる。さらに、金属、セラミックス、ガラスなどの

無機材料を適当な高分子で被覆したり、表面を直接修飾したものも好適に用いられる。

本発明の材料の形状は、繊維状、中空糸状、ビーズ状、平膜状、粉状などを用いることができるが、特に血球と血漿を分離せずにカラムに循環する全血体外循環にも適した、繊維状、中空糸状あるいはビーズ状のものが好ましく用いられる。吸着率を上げるには、接触面積の大きい多孔性の材料が好ましい。また、ビーズとしては、カラムに充填した際の圧損が少なくかつ表面積の大きいものが良いので、粒径が50～1000  $\mu\text{m}$ のものが好ましく、200～700  $\mu\text{m}$ のものがさらに好ましい。

上記した本発明の吸着材は、HMGタンパクを含む血清を吸着処理に供した場合に、HMGタンパクの吸着率が50%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上であり、血清中のアルブミンの吸着率が20%以下、好ましくは15%以下、さらに好ましくは10%以下である、HMGタンパクを選択的に吸着するものが特に好ましい。このようなHMGタンパク選択吸着性の吸着材は、上記した好ましい官能基を上記した好ましい範囲の密度で水不溶性担体に固定化することにより得ることができ、具体的な例が下記実施例に複数記載されている。

なお、ここで、HMGタンパク及びアルブミンの「吸着率」とは、正常ヒト血清に対してウシHMG-1タンパクを600 ng/mlの濃度で添加した試料溶液0.4 mlに対して、吸着材50  $\mu\text{l}$ を添加し、37℃で2時間振盪させた場合に、試料溶液中のウシHMG-1タンパクの何%が吸着されるか、及び試料溶液中の血清アルブミンの何%が吸着されるかを意味する。

上記した各官能基を有する物質を水不溶性担体に共有結合で固定化する方法は、臭化シアンにより活性化した担体との反応、カルボジイミドによる縮合、アミノ基、チオール基と反応する2価性反応試薬による架橋、グルタルアルデヒドによる架橋などの公知の方法により行うことができる。

なお、上記から明らかなように、上記官能基を有する物質を水不溶性担体に共有結合により結合させて固定化したものも本発明で言う「物質を固定化した水不

溶性担体」に包含される。また、上記官能基を水不溶性担体の合成段階から導入又は含んで成るものも「物質を固定化した水不溶性担体」に包含される。

本発明の吸着材を、カラムに充填し、HMGタンパク除去用体液浄化カラムとすることができる。吸着材のカラムへの充填方法は、繊維状材料であれば、  
5 織物、編物、不織布など布状の形態にして積層充填して、あるいは孔のあいた中空の中心パイプの周りに巻き付けて液を内側から外側に透過させる方法などが用いられる。

本発明の吸着材をカラムに充填し、患者の血液または血漿などのHMGタンパクを含む体液を体外循環の方法で透過させることにより、敗血症などの疾患の治療を行うことができる。本発明のカラムは、細菌成分を吸着する体液浄化カラム  
10 と合わせて用いることにより、特に高い敗血症の治療効果を得ることが期待できる。さらには本発明の吸着材は、癌、自己免疫疾患などの治療にも好適に用いられ得る。

#### 実施例

15 以下、実施例に基づき本発明をより具体的に説明する。

#### (測定方法)

##### (1) HMG-1の吸着率

各実施例における反応の前後の溶液中のHMG-1濃度をELISA法で定量し、実施例4においては以下の式で吸着率を算出した。

20 
$$\text{吸着率}(\%) = \{1 - \text{吸着後の濃度}(\text{ng/ml}) \div \text{吸着前の濃度}(\text{ng/ml})\} \times 100$$

また、実施例1～3においては含水率の高い吸着体を添加することによる溶液量の増加を考慮し、以下の式で近似的に吸着率を算出した。

$$\text{吸着率}(\%) = \{1 - \{\text{吸着後の濃度}(\text{ng/ml}) \times 0.45(\text{ml})\} \div \{\text{吸着前の濃度}(\text{ng/ml}) \times 0.4(\text{ml})\}\} \times 100。$$

25 (注：0.45＝吸着後の反応液量(ml)、0.4＝吸着前の反応液量(ml))

##### (2) アルブミンの吸着率

反応前後の血清アルブミン濃度を自動血液生化学分析装置（富士フィルム社製富士ドライケム5500）を用いて測定し、HMG-1の吸着

率と同様にしてアルブミンの吸着率を算出した。

#### 実施例 1 各種官能基を有するビーズによる HMG-1 の吸着

正常ヒト血清に対してウシ HMG-1 タンパクを  $600 \text{ ng/ml}$  の濃度で添加した溶液  $0.4 \text{ ml}$  に対して、以下に示す各種の官能基を含有する架橋アガロースビーズ  $50 \mu\text{l}$  を添加し、 $37^\circ\text{C}$  で 2 時間振とう反応した。

吸着体 (1)  $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ 、(2)  $-\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{H}$ 、(3)  $-\text{SO}_3^-$ 、(4)  $-\text{COO}^-$ 、(5)  $-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}_3$ 、(6)  $-\text{C}_6\text{H}_5$ 。

コントロールとして、ビーズを添加しない溶液を同様に 2 時間振とう反応した。反応前後の血清中の HMG-1 およびアルブミン濃度を測定し、吸着率 (%) を算出した。結果を表 1 に示す。

これら官能基を有する不溶性担体のなかで、カチオン性の官能基 (1)、(2) およびアニオン性の官能基 (3)、(4) が高い効率で HMG-1 を吸着した。また、疎水性の官能基 (5)、(6) によっても吸着が認められた。一方、これらの吸着体によるアルブミンの吸着は少ないことが示された。

表 1

吸着体	HMG-1 吸着率 (%)	アルブミン吸着率 (%)
コントロール	0	0
(1) $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	99	7
(2) $-\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{H}$	97	17
(3) $-\text{SO}_3^-$	97	10
(4) $-\text{COO}^-$	88	7
(5) $-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}_3$	51	15
(6) $-\text{C}_6\text{H}_5$	69	17

#### 実施例 2 生理活性物質固定化ビーズによる吸着

表 2 に示す各種の生理活性物質を固定化した架橋ビーズを用いて、実施例 1 と同様に正常ヒト血清中の HMG-1 の吸着実験を行った結果、表 2 に示すように、(2) ヘパリン、(4) ポリ L リジン、(5) 硫酸デキストランおよび(7) ヒスタミンを固定化した材料により、血清中の HMG-1 が高い効率で吸着除去され、生体に必要な物質であるアルブミンの吸着は少ないことが示された。

なお、各吸着材は、具体的には次のようにして製造した。臭化イオンで活性化した架橋アガロースビーズ 1 g に対して、それぞれの生理活性物質を 5 mg / ml で溶解した 0.5 M 塩化ナトリウムを含む 0.1 M 炭酸水素ナトリウム溶液 10 ml を混合し、4℃で 24 時間反応させた。その後 0.1 M のエタノールアミンを室温で 2 時間反応させて未反応の活性基をブロッキングした後、蒸留水で洗浄し、吸着実験に用いた。

表 2

吸着体	HMG-1 吸着率 (%)	アルブミン吸着率 (%)
コントロール	0	0
(1) DNA-アガロース	39	13
(2) ヘパリンアガロース	98	17
(3) ポリミキシンBアガロース	30	17
(4) Poly-L-リジンアガロース	97	17
(5) 硫酸デキストラン	91	13
(6) ヒスタミンアガロース	72	10

### 実施例 3 アミノ酸固定化ビーズによる吸着

表 3 に示すアミノ酸を固定化した架橋アガロースビーズを用いて、実施例 1 と同様に正常ヒト血清中の HMG-1 の吸着実験を行った結果、表 3 に示すように、(2) アルギニン固定化材料が高い吸着を示し、(1) リジン、(2) トリプトファン固定化材料によっても吸着が認められた。これら材料によりアルブミンの吸着は少なかった。

なお、各吸着材は、具体的には次のようにして製造した。臭化イオンで活性化  
した架橋アガロースビーズ1 gに対して、それぞれのアミノ酸を5 mg/mlで  
溶解した0.5 M塩化ナトリウムを含む0.1 M炭酸水素ナトリウム溶液10 mlを  
混合し、4℃で24時間反応させた。その後0.1 Mのエタノールアミンを室温で  
2時間反応させて未反応の活性基をブロッキングした後、蒸留水で洗浄し、吸着  
実験に用いた。

表 3

吸着体	HMG-1 吸着率 (%)	アルブミン吸着率 (%)
コントロール	0	0
(1) L-リジン-アガロース	52	10
(2) L-アルギニン-アガロース	83	13
(3) L-フェニルアラニン-アガロース	31	13
(4) L-トリプトファン-アガロース	57	10

#### 実施例4 ヘパリン固定化繊維状担体による吸着

50重量比の海成分（46重量比のポリスチレンと4重量比のポリプロピレン  
の混合物）と50重量比の島成分（ポリプロピレン）とからなるアメリカ特許4,  
661,260記載の海島型複合繊維（厚さ：2.6デニール、島の数：16）を50  
gのN-メチロール- $\alpha$ -クロロアセトアミド、400gのニトロベンゼン、4  
00gの98%硫酸、0.85gのパラホルムアルデヒドの混合溶液と20℃で  
1時間反応させた。そして、繊維をニトロベンゼンで洗浄し、水中に入れて反応  
を停止させた。その後、繊維をメタノールおよび温水で再び洗浄することによっ  
て、クロロアセトアミドメチル化架橋ポリスチレン繊維（以下AMPSt繊維と  
略す）を得た。

AMPSt繊維300mgに対して1%v/vのエチレンジアミン0.1M炭  
酸水素ナトリウム溶液8mlを37℃3時間反応させ、繊維へのアミノ基の導入  
を行った。得られたアミノ化繊維を洗浄後、6.7mg/mlのヘパリン水溶液  
6mlおよび100mg/mlの1-エチル-3,3ジメチルアミノプロピルカ

ルボジイミド塩酸塩 2 ml を添加し、室温で 21 時間反応を行うことでヘパリン化繊維を調製した。これを吸着体 A とする。

一方、AMPSt 繊維 300 mg に対して、1 mg/ml のヘパリン-アルブミン結合標品（シグマ社）の 0.1 M 炭酸水素ナトリウム（pH 9.6）溶液 8 ml を 37°C 16 時間反応させ、その後繊維の未反応活性基を最終濃度 0.1 M のトリス塩酸を反応させてブロックすることで、ヘパリン-アルブミン化繊維を調製した。これを吸着体 B とする。

正常ヒト血清に対して、ウシ HMG-1 タンパクを 600 ng/ml の濃度で添加した溶液 0.4 ml に対して、上述の方法で作製した吸着体 A または吸着体 B 20 mg を加えて、37°C で 2 時間振とう反応した。コントロールとして、繊維を添加しない溶液を同様に 2 時間振とう反応した。反応前後の血清中の HMG-1 およびアルブミン濃度を測定し、吸着率（%）を算出した結果を表 4 に示す。これらヘパリンを固定化した繊維状の材料により、血清中の HMG-1 が吸着除去されることが示された。また、これら材料によるアルブミンの吸着は少なかった。

表 4

吸着体	HMG-1 吸着率 (%)	アルブミン吸着率 (%)
コントロール	0	0
(1) 吸着体 A	61	15
(2) 吸着体 B	89	10

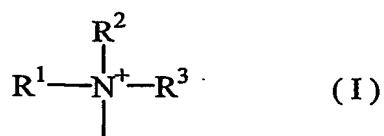
## 請求の範囲

1. 水素結合可能な官能基及び／又は疎水性の官能基を有する物質が固定化された水不溶性担体から成るハイモビリティーグループタンパクの吸着材。

5 2. 前記水素結合可能な官能基がカチオン性の官能基である請求項1記載の吸着材。

3. 前記カチオン性の官能基が1級アミノ基、2級アミノ基、3級アミノ基、イミノ基及び／又は4級アンモニウム基である請求項2記載の吸着材。

4. 前記カチオン性の官能基が、下記一般式(I)



10 (ただし、式中、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 及び $\text{R}^3$ は、互いに独立に、水素原子又は炭素数1～5のアルキル基を示す)

で表される請求項3記載の吸着材。

5. 前記一般式(I)中、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 及び $\text{R}^3$ は、互いに独立に、水素原子又は炭素数1若しくは2のアルキル基である請求項4記載の吸着材。

15 6. 前記一般式(I)中、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 及び $\text{R}^3$ が全てメチル基である請求項5記載の吸着材。

7. 前記水素結合可能な官能基がアニオン性の官能基である請求項1記載の吸着材。

8. 前記アニオン性の官能基がカルボキシル基、硫酸エステル基、スルホン酸基、及び／又はリン酸基である請求項7記載の吸着材。

20 9. 前記疎水性の官能基が、炭素数6以上のアルキル基又は芳香族基である請求項1記載の吸着材。

10. 水素結合可能な官能基及び／又は疎水性の官能基を有する物質がペプチド、アミノ酸又は多糖類である請求項1記載の吸着材。

25 11. 水素結合可能な官能基を有する物質が、側鎖にアミノ基を有するペプチド又はアミノ酸である請求項3記載の吸着材。

12. 水素結合可能な官能基を有する物質がポリリジンである請求項11記載



の吸着材。

13. 硫酸エステル基を有する多糖類が固定化されている請求項7記載の吸着材。

5 14. 前記多糖類がヘパリン若しくは硫酸デキストラン又はこれらの誘導体である請求項13記載の吸着材。

15. ハイモビリティーグロブタンパクに対する抗体が水不溶性担体に結合されて成るハイモビリティーグロブタンパクの吸着材。

16. ハイモビリティーグロブタンパクの吸着率が50%以上であり、かつ血清アルブミンの吸着率が20%以下である請求項15記載の吸着材。

10 17. 前記水不溶性担体が繊維状の形状を持つ請求項1ないし16のいずれか1項に記載の吸着材。

18. 前記水不溶性担体がビーズ状の形状を持つ請求項1ないし16のいずれか1項に記載の吸着材。

19. 敗血症治療用の、請求項1ないし18のいずれか1項に記載の吸着材。

15 20. カラムと、該カラムに充填された請求項1ないし19のいずれか1項に記載の吸着材とを含むハイモビリティーグロブタンパク除去用体液浄化カラム。

21. 全血体外循環が可能である、請求項20記載の体液浄化カラム。

22. 敗血症治療用の請求項20又は21記載の体液浄化カラム。

20 23. 請求項1ないし18のいずれか1項に記載の吸着材と体液とを接触させて体液中のハイモビリティーグロブタンパクを該吸着材に吸着させることを含む、体液中のハイモビリティーグロブタンパクの吸着方法。

24. 請求項20ないし22のいずれか1項に記載の体液浄化カラムを用いて行われる請求項23記載の方法。

25. 前記体液が血液である請求項23又は24記載の方法。

25 26. 敗血症治療のために行われる請求項24ないし25のいずれか1項に記載の方法。

27. 請求項20ないし22のいずれか1項に記載の体液浄化カラムおよび細菌由来物質を吸着する体液浄化カラムを合わせて用いる請求項26記載の方法。

28. 請求項1ないし18のいずれか1項に記載の吸着材の、体液中のハイモビリティーグロブタンパクの吸着用材料の製造のための使用。

28. 前記体液が血液である請求項27記載の使用。

29. 前記吸着用材料が、敗血症治療用である請求項27又は28記載の使用。

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/02936

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61M 1/36, B01J 20/26

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61M 1/36, B01J 20/26

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2001
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2001	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2001

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 92/16276, A1 (Merck & Co., Inc.), 01 October, 1992 (01.10.92), Full text & JP, 6-506210, A	1-29
A	US, 5661145, A (Harry R. Davis), 26 August, 1997 (26.08.97), Full text (Family: none)	1-29

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
03 July, 2001 (03.07.01)

Date of mailing of the international search report  
17 July, 2001 (17.07.01)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

7

8

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61M 1/36, B01J 20/26

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61M 1/36, B01J 20/26

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年  
 日本国公開実用新案公報 1971-2001年  
 日本国登録実用新案公報 1994-2001年  
 日本国実用新案登録公報 1996-2001年

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 92/16276, A1 (MERCK & CO., INC.) 1. 10月. 1992 (01. 10. 92) 全文 & JP, 6-506210, A	1-29
A	US, 5661145, A (Harry R. Davis) 26. 8月. 1997 (26. 08. 97) 全文 (ファミリー無し)	1-29

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

03. 07. 01

国際調査報告の発送日

17.07.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
 郵便番号100-8915  
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

生越 由美



3E

8208

電話番号 03-3581-1101 内線 3346



7  
2  
14

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 01PF220 の書類記号 - PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO1/02936	国際出願日 (日.月.年) 05.04.01	優先日 (日.月.年) 05.04.00
出願人(氏名又は名称) 東レ株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。





A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>7</sup> A61M 1/36, B01J 20/26

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>7</sup> A61M 1/36, B01J 20/26

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年  
日本国公開実用新案公報 1971-2001年  
日本国登録実用新案公報 1994-2001年  
日本国実用新案登録公報 1996-2001年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 92/16276, A1 (MERCK & CO., INC.) 1. 10月. 1992 (01. 10. 92) 全文 & JP, 6-506210, A	1-29
A	US, 5661145, A (Harry R. Davis) 26. 8月. 1997 (26. 08. 97) 全文 (ファミリー無し)	1-29

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

03. 07. 01

国際調査報告の発送日

17.07.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

生越 由美

3E

8208

電話番号 03-3581-1101 内線 3346



PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION  
International Bureau



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification <sup>5</sup> : <b>B01D 15/08</b>	<b>A1</b>	(11) International Publication Number: <b>WO 92/16276</b> (43) International Publication Date: 1 October 1992 (01.10.92)
--	-----------	---

(21) International Application Number: PCT/US92/01864  
(22) International Filing Date: 9 March 1992 (09.03.92)  
(30) Priority data:  
668,831 13 March 1991 (13.03.91) US

(60) Parent Application or Grant  
(63) Related by Continuation  
US 668,831 (CIP)  
Filed on 13 March 1991 (13.03.91)

(71) Applicant (for all designated States except US): MERCK & CO., INC. [US/US]; 126 E. Lincoln Avenue, Rahway, NJ 07065 (US).

(72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only) : HAYTKO, Peter, N. [US/US]; 1811 Main Street, Rahway, NJ 07065 (US). WILDMAN, Arthur, S., Jr. [US/US]; 33 Hillcrest Road, Martinsville, NJ 08836 (US).

(74) Agent: WINOKUR, Melvin; 126 E. Lincoln Avenue, Rahway, NJ 07065 (US).

(81) Designated States: AT (European patent), BE (European patent), CA, CH (European patent), DE (European patent), DK (European patent), ES (European patent), FR (European patent), GB (European patent), GR (European patent), IT (European patent), JP, LU (European patent), MC (European patent), NL (European patent), SE (European patent), US.

Published  
With international search report.

(54) Title: PROCESS FOR PURIFICATION OF HMG-CoA REDUCTASE INHIBITORS

(57) Abstract

A process for the purification of an HMG-CoA reductase inhibitor employing preparative high performance liquid chromatography as well as a pharmaceutical composition comprising the HMG-CoA reductase inhibitor and pharmaceutically acceptable carrier.



**FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY**

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AT	Austria	FI	Finland	MI	Mali
AU	Australia	FR	France	MN	Mongolia
BB	Barbados	GA	Gabon	MR	Mauritania
BE	Belgium	GB	United Kingdom	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GN	Guinea	NL	Netherlands
BG	Bulgaria	GR	Greece	NO	Norway
BJ	Benin	HU	Hungary	PL	Poland
BR	Brazil	IE	Ireland	RO	Romania
CA	Canada	IT	Italy	RU	Russian Federation
CF	Central African Republic	JP	Japan	SD	Sudan
CG	Congo	KP	Democratic People's Republic of Korea	SE	Sweden
CH	Switzerland	KR	Republic of Korea	SN	Senegal
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SU	Soviet Union
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	TD	Chad
CS	Czechoslovakia	LU	Luxembourg	TG	Togo
DE	Germany	MC	Monaco	US	United States of America
DK	Denmark	MG	Madagascar		
ES	Spain				



5

-1-

10

TITLE OF THE INVENTION

PROCESS FOR PURIFICATION OF HMG-CoA REDUCTASE  
INHIBITORS

15 BACKGROUND OF THE INVENTION

This is a continuation in part of U. S.  
Serial Number 07/668,831, filed March 13, 1991.

High product purity is an important criterion  
for the manufacture of a safe and effective pharma-  
20 ceutical. HMG-CoA reductase inhibitors, such as  
lovastatin, simvastatin and pravastatin, are a  
recently introduced new class of cholesterol-lowering  
agents that effectively lower plasma cholesterol but  
must be taken on a long term basis. Thus it is  
25 particularly critical that HMG-CoA reductase  
inhibitors be administered in the highest possible  
purity.

30





- 2 -

Standard methods for the purification of organic molecules involve multiple recrystallization steps and employ large amounts of organic solvents. It would be highly desirable to employ a purification process that would yield a product purity of at least 99.5%, use no more than one crystallization with a recyclable solvent and be adaptable to high production volume.

High performance liquid chromatography (HPLC) is commonly used for the analytical determinations of compound purity. HPLC for large scale industrial solution preparations (preparative HPLC) has been employed in the separation and purification of proteins but it is believed not to have been employed in the large scale purification of relatively small molecules such as HMG-CoA reductase inhibitors.

#### DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

This invention relates to a process for the purification of HMG-CoA reductase inhibitors by high performance liquid chromatography to yield a product of purity of at least 99.5%. The HMG-CoA reductase inhibitors within this invention include, but are not limited to, lovastatin, simvastatin, pravastatin, fluvastatin and mevastatin. The HPLC process of this invention offers a significant advantage in that no recrystallization is required to obtain a purity of at least 99.5% and typically only crystallization is employed. In addition, the HPLC process of this invention may be carried out with only one organic solvent, thus minimizing the need for recycling of solvent.



- 3 -

The process of this invention herein may employ either normal phase HPLC or reverse phase HPLC. For HMG-CoA reductase inhibitors exhibiting a tetrahydro-pyranone ring, such as lovastatin and simvastatin, the reverse phase procedure is preferred. The column packing may be uncoated silica, coated silica or porous graphitic carbon. The term coating as used herein includes both a physical and a chemical bonding of the binding group.

The crude HMG-CoA reductase inhibitor of approximately 85% or higher purity is dissolved in an organic solvent or a solution of an organic solvent and water. The mixture may be buffered to a pH between 2 and 9 with an organic or inorganic salt.

Buffers may include, but are not limited to, Tris-acetate, or acetic acid/ammonia. The resulting solution is placed on an HPLC column. The column packing may be regular or irregular in shape. The diameter of the packing material may range from about 1  $\mu\text{m}$  to about 100  $\mu\text{m}$ . Preferably, the packing material is irregularly-shaped octadecylsilane and the diameter of the packing material is between about 3  $\mu\text{m}$  and about 30  $\mu\text{m}$ .

The column packings include, but are not limited to, silica, octylsilane, dimethylsilane, octadecylsilane, cyano-silane, or polystyrene-divinylbenzene copolymer with an organosilyl stationary phase.



- 4 -

The column diameter may vary from 5 cm to 80 cm. The usual column length is approximately 25 cm. The column length may be extended as needed to effect the separation. Lengthening of the column may be accomplished by linking additional columns in series.

In general, the column is packed with the coated or uncoated silica in the following manner: the packing material is slurried in ethanol. The slurry is then transferred into the column and compressed at 55 bar using Dynamic Axial Compression (D.A.C.\*), a procedure described in U. S. Patent 3,996,609 and French Patent 73.07278. Alternatively, the column may be radially compressed. The ethanol is displaced with mobile phase. After packing the column is tested by collecting serial fractions and evaluating those fractions by standard analytical techniques.

The eluant is an organic solvent or a solution of an organic solvent and water which may also include a buffer of pH 2 to pH 9. The eluant is generally the same solvent or solvent mixture as the dissolving solvent but, if desired, the eluant may have a different composition. Preferably the eluant contains the same organic solvent and aqueous modifiers as the dissolving solvent. If desired, a gradient elution of the mobile phase may be employed to more rapidly elute the HMG-CoA reductase inhibitor through the column. The chromatography may be carried out at an operating temperature appropriate to the solvents employed, however a range of about 15° to about 60°C is preferred. In the preferred embodiment, isothermal conditions are maintained throughout the separation. Detection of the HMG-CoA



- 5 -

reductase inhibitor may be by spectroscopic means or by other physical means such as optical rotation or refractive index. The preferred means are by ultraviolet absorption or refractive index. After the HMG-CoA reductase inhibitor peak of interest is collected, a portion of the solvent is removed and an aqueous solution is added to crystallize the HMG-CoA reductase inhibitor. Generally, about one-third of the solvent mixture is removed and water is employed to crystallize the HMG-CoA reductase inhibitor. Alternatively about two-thirds of the solvent mixture is removed to crystallize the HMG-CoA reductase inhibitor. The crystallized inhibitor is then filtered and dried to yield a product of purity of at least 99.5% and with an overall yield of about 90%. Product purity is determined by HPLC relative to a reference standard. Yield is determined by weight.

The crude HMG-CoA reductase inhibitor is prepared following any of the literature procedures well known to those skilled in this art. Packing materials of uncoated or coated silica are commercially available. Porous graphitic carbon as a packing material is also commercially available in pre-packed columns.

The organic solvent, employed as the dissolving solvent or the eluant, is selected from acetonitrile, methanol, ethanol, acetone, tetrahydrofuran, isopropanol, ethyl acetate, methylene chloride, chloroform or a mixture thereof. The percent of organic solvent in an organic solvent/water mixture may vary from about 10% to about 90% organic solvent, preferably 65% to 75% organic solvent.





- 6 -

The present invention is also directed to purified forms of HMG-CoA reductase inhibitors or their salts which have a purity of at least 99.5%. In one class of the invention are lovastatin, simvastatin and pravastatin of purity 99.5% or better. Also included with the present invention are pharmaceutical compositions containing a HMG-CoA reductase inhibitor or a salt thereof of purity of at least 99.5% and particularly lovastatin, simvastatin and pravastatin of purity of at least 99.5%.

If desired the amount of any residual solvent, particularly acetonitrile, may be decreased by dissolution of the purified HMG-CoA reductase inhibitor in aqueous methanol and crystallizing therefrom as shown below in Example 6.

The pharmaceutically acceptable salts of the compounds of this invention include those formed from cations such as sodium, potassium, aluminum, calcium, lithium, magnesium, zinc, and from bases such as ammonia, ethylenediamine, N-methyl-glucamine, lysine, arginine, ornithine, choline, N,N'-dibenzylethylenediamine, chloroprocaine, diethanolamine, procaine, N-benzylphenethylamine, diethylamine, piperazine, tris(hydroxymethyl)aminomethane, and tetramethylammonium hydroxide.

The purified compounds of this invention may also be administered in combination with other cholesterol lowering agents such as those which inhibit an enzymatic pathway in the biosynthesis of cholesterol. Example of such agents would include



- 7 -

but are not limited to squalene synthetase inhibitors, HMG-CoA synthase inhibitors, and squalene epoxidase inhibitors. Illustrative of such inhibitors are the squalene synthetase inhibitors described in U. S. Patents 5,053,425; 5,055,487 and 5,026,554. Other cholesterol lowering agents that may be administered include niacin, probucol, and the fibric acids, clofibrate and gemfibrozil. Appropriate daily dosages for adults are niacin (2-8 gm), probucol (up to 1000 mg), clofibrate (up to 2 gm) and gemfibrozil (800-1500 mg).

The compounds of this invention may also be coadministered with pharmaceutically acceptable nontoxic cationic polymers capable of binding bile acids in a non-reabsorbable form in the gastrointestinal tract. Examples of such polymers include cholestyramine, colestipol and polymethyl-(3-trimethylaminopropyl)imino-trimethylene dihalide. The relative amounts of the compounds of this invention and these polymers is between 1:100 and 1:15,000.

#### EXAMPLE 1

4.6 g of crude lovastatin was dissolved in 200 mL of 70:30 acetonitrile/water which was injected onto a 5 cm diameter, 25 cm long stainless steel column packed with 10  $\mu$ m, irregular-shaped octadecylsilane HPLC packing material (RG1010-C18, The PQ Corporation, Conshohocken, PA). The eluant was 70:30 acetonitrile/water and the flow rate was approximately 150 mL/min. The lovastatin fraction was collected in a volume of 260 mL using UV



- 8 -

detection at 254 nm. The lovastatin fraction was eluted at  $K' = 2.0-3.0$ .  $K'$ , the capacity factor, is related to the retention time as described in USP - XXII (p. 1565; 1990). The resulting solution was concentrated by removal of one-third of the solvent, and the lovastatin was crystallized by the addition of water to give an acetonitrile concentration of approximately 25-30%. The pure lovastatin product was recovered by filtration and drying. Lovastatin with a purity of 99.7% w/w was recovered in an overall yield of 90%.

#### EXAMPLE 2

Lovastatin at a concentration of 2.3 g/100 mL was dissolved in a mixture of 70% acetonitrile/30% 0.02 M Tris-acetate (pH 7.4). The solution was loaded onto a 5 cm diameter, 25 cm long stainless steel column packed with 10  $\mu$ m, irregular-shaped octadecylsilane (RG1010-C18, The PQ Corporation, Conshohocken, PA). The eluant was 70% acetonitrile/30% water and the flow rate was approximately 150 mL/minute. Detection was by ultraviolet absorption at 254 nm. Lovastatin was eluted at  $K' = 2.0-3.0$ . The lovastatin peak was collected and one third the volume was removed by vacuum distillation at  $\leq 40^\circ\text{C}$ . Water was added to bring the acetonitrile concentration to 25-30%. The lovastatin was filtered and dried in vacuo at  $\leq 40^\circ\text{C}$ . Lovastatin with a purity of  $\geq 99.7\%$  was recovered in an overall yield of  $\geq 90\%$ .



- 9 -

EXAMPLE 3

4.6 g of crude lovastatin was dissolved in 200 mL of 70:30 acetonitrile/water buffered with 0.02 M Tris-acetate (pH 7.5). The solution was loaded onto a 5 cm diameter, 25 cm long column packed with 10  $\mu$ m, irregular-shaped octadecylsilane HPLC packing (RG1010-C18, The PQ Corporation, Conshohocken, PA). The eluant was 70:30 acetonitrile/water and the flow rate was approximately 150 mL/min. The lovastatin fraction was collected in a volume of 265 mL using UV detection at 254 nm. The lovastatin peak eluted at  $K' = 2.0-3.0$ . The resulting solution was concentrated by removal of one third of the solvent. Lovastatin was crystallized by the addition of water to give an acetonitrile concentration of approximately 25-30%. The pure lovastatin product was recovered by filtration and drying. Lovastatin with a purity of 99.7% w/w was recovered in an overall yield of 91%.

EXAMPLE 4

4.6 g of crude lovastatin was dissolved in 200 mL of 70:30 acetonitrile/water buffered with 0.02 M Tris-acetate (pH 7.5). The solution was loaded onto a 5 cm diameter, 25 cm long column packed with 10  $\mu$ m, irregular-shaped octadecylsilane HPLC packing (RG1010-C18, The PQ Corporation, Conshohocken, PA). The eluant was 70:30 acetonitrile/water and the flow rate was approximately 150 mL/min. The lovastatin fraction was collected in a volume of 265 mL using UV detection at 254 nm. The lovastatin peak eluted at  $K' = 2.0-3.0$ . The resulting solution was concentrated





- 10 -

by removal of two-thirds of the solvent, which crystallized the lovastatin. The pure lovastatin product was recovered by filtration and drying. Lovastatin with a purity of 99.7% w/w was recovered  
5 in an overall yield of 91%.

#### EXAMPLE 5

Lovastatin at a concentration of 4.5 g/100  
10 mL was dissolved in a mixture of 70% acetonitrile/30% 0.02 M Tris-acetate (pH 7.2). The 40°C solution was injected onto a 5 cm diameter, 25 cm long stainless steel column packed with 10-20 µm, irregular-shaped octadecylsilane HPLC packing (RG1020-C18, The PQ  
15 Corporation, Conshohocken, PA). The eluant was 70:30 acetonitrile/water and the flow rate was approximately 150 mL/min. The media and column were isothermally maintained at 40°C. The lovastatin fraction was collected in a volume of 500 mL using UV  
20 detection at 254 nm. The lovastatin fraction eluted at  $K' = 2.0-3.0$ . The resulting solution was concentrated by removal of two-thirds of the solvent and the lovastatin crystallized. The lovastatin was recovered by filtration and drying. Lovastatin with  
25 a purity 99.8% w/w was recovered in an overall yield of 90%.



- 11 -

EXAMPLE 6

6.0 g of the purified lovastatin prepared as described in Example 5 was dissolved in 100 mL of 95% methanol/5% water at 60° C. The 60° C solution was crystallized by the addition of an equal volume of 65% water/35% methanol. The resulting crystalline mixture was concentrated to one half volume. Lovastatin was recovered by filtration and drying. 5.98 g of lovastatin was recovered.

EXAMPLE 7

Simvastatin may be purified to a crystalline form of purity greater than 99.5% using procedures analogous to those described in Example 5. Crude simvastatin is used in place of crude lovastatin.

EXAMPLE 8

Pravastatin may be purified to a crystalline form of purity greater than 99.5% using a procedure analogous to that in Example 5, but substituting crude pravastatin for the crude lovastatin.



- 12 -

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A process for purifying a crude HMG-CoA reductase inhibitor which comprises:

- 5       (1) placing a solution of the crude HMG-CoA reductase inhibitor on a high performance liquid chromatography column wherein said column is packed with silica optionally coated with a stationary phase selected from  
10       a group consisting of a triorganosilyl, a cyanoorganosilyl or a polystyrene-divinylbenzene copolymer with an organosilyl, or said column is packed with a porous graphitic carbon;
- 15       (2) eluting with a solvent mixture comprising:  
      (a) an organic solvent selected from a group consisting of acetonitrile, methanol, ethanol, acetone, tetrahydrofuran, isopropanol, ethyl acetate, methylene chloride or chloroform,  
20       or a mixture thereof and optionally  
      (b) water or an aqueous solution selected from: phosphoric acid, acetic acid;
- (3) removing about 30 to 35 percent of the solvent mixture from the eluted fraction containing HMG-CoA reductase; and  
25       (4) treating the eluted fraction containing HMG-CoA reductase inhibitor fraction with water to crystallize the HMG-CoA reductase inhibitor.

30



- 13 -

2. A process of Claim 1 wherein the HMG-CoA reductase inhibitor is selected from the group consisting of lovastatin, simvastatin, pravastatin, fluvastatin or mevastatin.

5

3. A process of Claim 2 wherein the HMG-CoA reductase inhibitor is selected from lovastatin or simvastatin.

10

4. A process of Claim 2 wherein the HMG-CoA reductase inhibitor is lovastatin.

15

5. A process of Claim 3 wherein the column is packed with a silica coated with an octadecylsilane stationary phase.

6. A process of Claim 5 wherein the solvent mixture is acetonitrile and water.

20

7. A process of Claim 6 wherein the solvent mixture is 70% acetonitrile and 30% water.

25

8. A process of Claim 7 wherein the operating temperature of the chromatography is between 15° to 60°C.

30

9. A process of Claim 8 wherein about one-third of the solvent mixture is removed from the eluted fraction containing the HMG-CoA reductase inhibitor.





- 14 -

10. A process of Claim 1 further comprising the filtering and drying of the HMG-CoA reductase inhibitor to yield a product of purity  $\geq$  99.5%.

5 11. A process for purifying a crude HMG-CoA reductase inhibitor which comprises:

(1) placing a solution of the crude HMG-CoA reductase inhibitor on a high performance liquid chromatography column wherein said  
10 column is packed with silica optionally coated with a stationary phase selected from a group consisting of a triorganosilyl, a cyanoorganosilyl or a polystyrene-polystyrene-divinylbenzene copolymer with an  
15 organosilyl, or said column is packed with a porous graphitic carbon;

(2) eluting with a solvent mixture comprising:

(a) an organic solvent selected from a group consisting of acetonitrile, methanol,  
20 ethanol, acetone, tetrahydrofuran, isopropanol, ethyl acetate, methylene chloride or chloroform, or a mixture thereof and optionally

(b) water or an aqueous solution selected from: phosphoric acid, acetic acid; and

25 (3) removing about 60 to 65% of the solvent mixture from the eluted fraction containing HMG-CoA reductase inhibitor to crystallize the HMG-CoA reductase inhibitor.

30 12. An HMG-CoA reductase inhibitor of purity at least 99.5% or a pharmaceutically acceptable salt thereof.



- 15 -

13. A compound of Claim 12 wherein the HMG-CoA reductase inhibitor is selected from the group consisting of lovastatin, simvastatin and pravastatin or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

5

14. A compound of Claim 13 wherein the HMG-CoA reductase inhibitor is lovastatin.

10

15. A compound of Claim 13 wherein the HMG-CoA reductase inhibitor is simvastatin.

16. A compound of Claim 13 wherein the HMG-CoA reductase inhibitor is pravastatin.

15

17. An HMG-CoA reductase inhibitor purified by a process comprising high performance liquid chromatography and wherein the HMG-CoA reductase inhibitor has a purity of at least 99.5%.

20

18. A pharmaceutical composition comprising a nontoxic therapeutically effective amount of a compound of Claim 12 and a pharmaceutically acceptable carrier.

25

19. A pharmaceutical composition comprising a nontoxic therapeutically effective amount of a compound of Claim 12 in combination with a pharmaceutically acceptable nontoxic cationic polymer capable of binding bile acids in a non-reabsorbable form in the gastrointestinal tract and pharmaceutically acceptable carrier.

30



- 16 -

20. A pharmaceutical composition comprising  
a nontoxic therapeutically effective amount of a  
compound of Claim 12 in combination with a nontoxic  
therapeutically effective amount of a cholesterol  
lowering agent selected from the group consisting of:
- (a) Squalene synthetase inhibitor;
  - (b) HMG-CoA synthetase inhibitor;
  - (c) Squalene epoxidase inhibitor;
  - (d) Probucol;
  - (e) Niacin;
  - (f) Gemfibrozil; and
  - (g) Clofibrate.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application

US92/01364

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (If several classification symbols apply, indicate all)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC IPC(5): BOLD 15/08 US Cl.: 210/656; 435/125		
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum Documentation Searched		
Classification System	Classification Symbols	
U.S.	210/198.2, 635, 656; 422/70; 435/125; 436/161; 514/356, 451; 514/460, 543, 571, 642, 643, 712, 824; 549/292	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the extent that such documents are included in the Fields Searched		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No. *
Y	US, A, 4,533,494 (UCHIYAMA) 06 August 1985 See the entire document	1-11
X Y	US, A, 4,997,755 (WILLIAMSON) 05 March 1991 See the entire document	2-8, 12-14, 17 1, 9-11, 15-16
Y	US, A, 4,833,258 (SMITH) 23 May 1989 See the entire document	1-11
Y	US, A, 4,965,200 (CHEN) 23 October 1990 See the entire document	1-11
Y	US, A, 4,719,229 (REAMER) 12 January 1988 See the entire document	1-11
X	US, A, 4,231,938 (MONAGAN) 04 November 1980 See the entire document	12-14
X, P	US, A, 5,089,523 (VARMA) 18 February 1992 See the entire document	1, 18-20
X, E	US, A, 5,099,035 (SAUNDERS) 24 March 1992 See the entire document	12, 18-20
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>"F" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"I" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"V" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"S" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of the International Search Report	
28 April 1992	15 JUN 1992	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
ISA/US	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>for Sun Uk Kim</div> <div>             NGUYEN HUU            INTERNATIONAL DIVISION         </div> </div>	





**FURTHER INFORMATION CONTAINED FROM THE SECOND SHEET**

X, E	US. A. 5,102,911 (LEE) 07 April 1992 See the entire document	12,18-20
X	The Merck Index, 11th Edition, Published 1989 (Rahway, New Jersey) See compounds 5460, 7712, 8491	12-16

**V ☐ OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:

- 1 ☐ Claim numbers \_\_\_\_\_ because they relate to subject matter not required to be searched by the Authority, namely:
  
- 2 ☐ Claim numbers \_\_\_\_\_ because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out <sup>1</sup>, specifically:
  
- 3 ☐ Claim numbers \_\_\_\_\_ because they are dependent claims not drafted in accordance with the second and third sentences of PCT Rule 6.4(e).

**VI ☐ OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:

- 1 ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application.
- 2 ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:
- 3 ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:
- 4 ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, the International Searching Authority does not invite payment of any additional fee.

**Remarks on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

